

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2009. – Вип. 17, т. 3. – С. 24–27.
Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology. Ecology. – 2009. – Vol. 17, N 3. – P. 24–27.

УДК 579.22

І. В. Жерносекова, Т. Г. Хуторна, О. А. Тимчук, Н. П. Черногор, А. І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

РОЛЬ ТРЕОНІНУ В СИНТЕЗІ СТИМУЛЯТОРА РОСТУ СТРЕПТОМИЦЕТОМ

Показано позитивну дію треоніну на стимулювальну активність стрептомицету. Методом гель-хроматографії виявлено збільшення кількості груп фракцій культуральної рідини, які стимулювали ріст дріжджів роду *Candida*. Показано, що треонін підвищував сумарну питому стимулювальну активність фракцій на 14 %. Ступінь очищення контрольної (без треоніну) та дослідної (із треоніном) груп фракцій культуральної рідини склав 2,0 та 1,6 раза.

И. В. Жерносекова, Т. Г. Хуторная, А. А. Тымчук, Н. П. Черногор, А. И. Винников

Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара

РОЛЬ ТРЕОНИНА В СИНТЕЗЕ СТИМУЛЯТОРА РОСТА СТРЕПТОМИЦЕТОМ

Показано положительное действие треонина на стимулирующую активность стрептомицета. Методом гель-хроматографии выявлено увеличение количества групп фракций культуральной жидкости, стимулирующих рост дрожжей рода *Candida*. Показано, что треонин способствовал повышению суммарной удельной стимулирующей активности фракций на 14 %. Степень очистки контрольной (без треонина) и опытной (с треонином) групп фракций культуральной жидкости составила 2,0 и 1,6 раза.

I. V. Zhernosekova, T. G. Hutornaya, A.A. Tymchuk, N.P. Chernogor, A.I. Vinnikov

Oles' Gonchar Dnipropetrovsk National University

ROLE OF THREONIN IN SYNTHESIS OF GROWTH STIMULATOR BY *STREPTOMYCES*

Positive effect of threonin on stimulating activity of *Streptomyces* was shown. Increase of quantity of fractions group in cultural liquid was revealed by a method of gel-penetrating chromatography. The fractions stimulate the *Candida* yeast growth. Threonin promotes 14 % increase of the total specific stimulating activity of the fractions. Control (without threonin) and experimental (with threonin) fractions groups of the cultural liquids were purified 2.0 and 1.6 times respectively.

Вступ

Широко відома здатність мікроорганізмів синтезувати біологічно активні речовини, на їх основі створюють біопрепарати для використання у сільському господарстві. Останім часом для підвищення продуктивності сільськогосподарських культур пропонується велика кількість стимуляторів росту рослин [2; 4], які впливають на процеси проростання насіння та розвиток рослини [3; 6]. Стимулятори росту мікробного походження – препарати м'якої дії, які регулюють процеси онтогенезу рослини, що викликає стимулювання схожості насіння, коренеутворення, формування проростків

© І. В. Жерносекова, Т. Г. Хуторна, О. А. Тимчук, Н. П. Черногор, А. І. Вінніков, 2009

[3; 5; 6], підвищення ефективності бобово-ризобіального симбіозу [2]. Використання мікробних біопрепаратів зменшує збитки сільського господарства, збільшує врожаї та є безпечним для навколишнього середовища.

У зв'язку з тим, що штам стрептоміцету *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 синтезує стимулятор росту глікопротеїдної природи [7], актуальним є створення біопрепарату з високим рівнем стимулювальної активності. У літературі є повідомлення про стимуляцію синтезу біологічно активних речовин у більшості бактерій амінокислотами. Внесення триптофану у середовище культивування мікроорганізмів стимулювало синтез фітогормону, позитивний вплив якого отримано на коренях квасолі [5].

Мета даної роботи – виявлення можливості інтенсифікації синтезу стимулятора росту у стрептоміцету при додаванні екзогенного треоніну у середовище вирощування.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт дослідження – рифампіциностійкий мутант стрептоміцету (штам *S. recifensis* var. *lyticus* 2P-15), який синтезував літичні ферменти та стимулятор росту. Культивування штаму проводили на ферментаційному середовищі, склад якого наведено у праці [1], в яке вносили додатково треонін у концентрації 100 мкг/мл. Контрольне середовище треоніну не містило.

Виділення стимулятора росту проводили з використанням методу гел'фільтрації. Культуральну рідину штаму *S. recifensis* var. *lyticus* 2P-15, отриману після 72 год. культивування з треоніном (надалі КР із треоніном) та без амінокислоти (надалі КР без треоніну) відділяли від міцелію та використовували для очищення та виділення стимулятора. На колонку (1,2×30 см), заповнену сефадексом G-75 та урівноважену 0,5 М NaCl, наносили 5 мл культуральної рідини (1,6 мг білка). Елюцію білка з колонки проводили зі швидкістю 82 мл/год. 0,5 М NaCl. Фракції культуральної рідини збирали по 3 мл (50 фракцій), профіль білка контролювали спектрофотометрично на СФ-46 при 280 нм. У подальшому зібрані фракції культуральної рідини поєднували у групи (8 груп), у яких визначали білок методом Bradford [8]. Об'єднані фракції використовували для дослідження їх стимулювальної активності, яку визначали оптичним методом і розраховували в од./мг відносно клітин добової культури дріжджів *Candida tropicalis*, яку готували за 10-м стандартом мутності [1].

Результати та їх обговорення

При гел'хроматографії з використанням сефадексу G-75 виникав досить чіткий розподіл основного пула білків культуральної рідини, синтезованої як за присутності треоніну, так і без нього (рис.). КР без треоніну розділилася на сім, а з треоніном – на чотири піки. Усі 50 елюйованих фракцій об'єднано у вісім груп, перша з яких для обох зразків складала вільний об'єм колонки.

Об'єднані групи фракцій КР без треоніну II–V зосереджувалися у великому білковому піку та мали максимальну концентрацію білка, яка складала 0,164–0,234 мг/мл. Стимулювальною активністю володіли тільки дві (з восьми) групи фракцій цього зразка (VI та VII). Вони мали найменшу кількість білка (0,026 та 0,027 мг/мл) та збільшили накопичення біомаси клітин дріжджів на 55–67 %. Саме ці фракції, за даними Н. П. Чорногор [7], вважаються стимулятором росту штаму *S. recifensis* var. *lyticus* 2P-15. Ці групи (VI, VII) характеризувалися високою питомою стимулювальною активністю, більшою в 1,2 раза для VII групи порівняно з VI групою (табл.). Для КР із треоніном групи фракцій II–V, що мали велику кількість білка (0,152–0,176 мг/мл), також зосередилися в основному білковому піку. Але стимулю-

вальною активністю володіли три групи фракцій культуральної рідини VI, VII, VIII, які містили мінімальну кількість білка 0,015–0,024 мг/мл відповідно та характеризувалися великою питомою стимулювальною активністю. Нефракціонована КР без треоніну викликала накопичення біомаси клітин дріжджів на 76 %, а зразок нефракціонованої КР з треоніном у 1,5 раза сильніший (табл.). Питома стимулювальна активність останнього більша за КР без амінокислоти на 42 %.

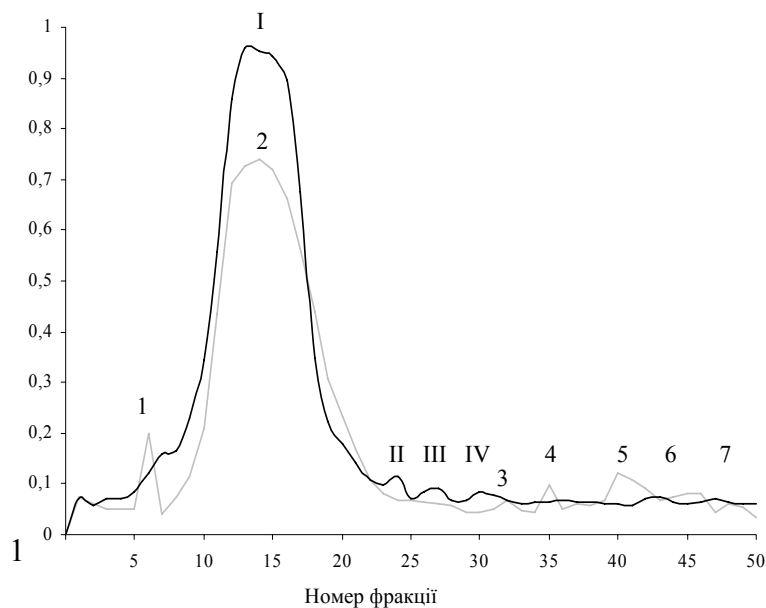


Рис. Гель-хроматографія культуральної рідини штаму *S. recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на сефадексі G-75: I–IV – кількість білкових піків культуральної рідини з треоніном; 1–7 – кількість білкових піків культуральної рідини без треоніну

Таблиця

Характеристика культуральної рідини штаму *S. recifensis* var. *lyticus* 2P-15, синтезованого у різних умовах

Варіант досліджу	Номер фракції КР	Накопичення біомаси за оптичною щільністю		Концентрація білка, мг/мл	Стимулювальна активність, од/мл	Питома стимулювальна активність			
		$\bar{X} \pm m$, умовн. од.	К, %			од./мг	Σ фракцій од./мг	К, %	ступінь очистки
Контроль без КР КР без треоніну КР із треоніном	не фракціонована	0,17 ± 0,03	100	–	–	–	–	–	–
		0,30 ± 0,08*	176	0,33	2530	7666	–	100	1,0
		0,46 ± 0,05	270	0,52	5670	10904	–	142	1,0
Контроль без фракції КР без треоніну КР із треоніном	–	0,09 ± 0,01	100	–	–	–	–	–	–
	VI	0,14 ± 0,02*	155	0,026	183	7038	15297	100	2,0
	VII	0,15 ± 0,01	167	0,027	223	8259			
	VIII	0,12 ± 0,01	133	0,015	110	7333			
	VI	0,12 ± 0,01	133	0,015	110	7333	17458	114	1,6
	VII	0,15 ± 0,01	167	0,018	45	2500			
	VIII	0,13 ± 0,01	155	0,024	183	7625			

Примітки: КР – культуральна рідина, К – відношення до контролю, * – $p < 0,05$, “–” – не визначали.

Виявлено, що сумарна стимулювальна питома активність фракцій КР із треоніном після гель-фільтрації дорівнювала 17458 од./мг, що перевищувало активність очищеного зразка без треоніну на 2161 од./мг. Тобто стимулятор, синтезований за присутності треоніну, викликав збільшення сумарної питомої стимулювальної активності продуцента на 14 % порівняно зі стимулятором без амінокислоти. Наявність треоніну в середовищі культивування стрептоміцету також збільшила кількість груп фракцій культуральної рідини (з 2 до 3), які проявили стимулювальну дію. Ступінь очищення фракцій КР без треоніну склав 100 %, а КР з треоніном – 60 %.

Отримані дані про збільшення кількості стимулювальних груп фракцій у культуральній рідині штаму *S. recifensis* var. *lyticus* 2P-15 та рівня їх активності, завдяки додаванню екзогенного треоніну в ростове середовище стрептоміцету, дозволять створити високоактивний біопрепарат для використання його у сільському господарстві.

Висновки

Треонін у концентрації 100 мкг/мл забезпечив збільшення кількості стимулювальних груп фракцій у культуральній рідині штаму *S. recifensis* var. *lyticus* 2P-15, що характеризувалися високим рівнем активності (17458 од./мг). Культуральна рідина штаму *S. recifensis* var. *lyticus* 2P-15 за наявності треоніну активніша за культуральну рідину без амінокислоти на 14 %, ступінь очищення стимулятора досягав 1,6 раза.

Бібліографічні посилання

1. **Біосинтетичні** характеристики мутантного штаму 2P-15 у присутності екзогенних амінокислот / І. В. Жерносекова, О. А. Тимчук, А. Г. Понізовцева та ін. // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2008. – Вип. 16, Т. 1. – С. 78–83.
2. **Действие** стимулятора роста растений бактозоля на *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 250a и его азотустойчивый мутант М-71 в условиях различной обеспеченности азотом / Л. В. Косенко, Н. М. Мандровская, Е. Д. Кругова, Л. Д. Варванец // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 1. – С. 40–47.
3. **Микроорганизмы** – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение / Е. А. Цавкелова, С. Ю. Климова, Т. А. Чердынцева, А. И. Нетрусов // Прикл. биохим. и микробиол. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 133–143.
4. **Научные** основы создания гранулированных микробных препаратов комплексного действия на растения / И. К. Курдиш, А. А. Рой, З. Т. Бега, Л. С. Чернова // Биологическая защита растений – основы стабилизации агроэкосистем. Матер. докл. Междунар. научн. конф. – Краснодар, 2004. – Вып. 3. – С. 81–83.
5. **Цавкелова Е. А.** Образование ауксинов бактериями, ассоциированными с корнями орхидей / Е. А. Цавкелова, Т. А. Чердынцева, А. И. Нетрусов // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 1. – С. 55–62.
6. **Церковняк Л. С.** Синтез амінокислот *Bacillus subtilis* IMB B-7223 у середовищі з гліцерофосфатом / Л. С. Церковняк, А. О. Рой, І. К. Курдиш // Мікробіол. журн. – 2009. – Т. 71, № 5. – С. 18–23.
7. **Чорногор Н. П.** Дослідження рістстимулюючих властивостей лізоензимного препарату *Streptomyces recifensis* variant *lyticus*. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 1998. – 20 с.
8. **Bradford M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 721. – P. 1117–1123.

Надійшла до редколегії 19.11.2009